

Gustavo Cancela e Penna

**Alterações moleculares na tumorigênese tireoidiana: análise  
imunohistoquímica da expressão das proteínas WWOX, FHIT, p53 e BRAF  
no Carcinoma Papilífero de Tireóide**

Defesa de dissertação, apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia Bioquímica e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Belo Horizonte  
2009

*À Deus, por sempre guiar a minha vida,  
À, Jú, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo,  
Ao meus pais, Francisco e Branca, como uma pequena retribuição a toda educação que sempre me  
proporcionaram.*

## **Agradecimentos:**

Durante a elaboração e execução dessa pesquisa, algumas pessoas foram fundamentais e imprescindíveis para que essa dissertação se realizasse. Aproveito esse espaço, para destacá-las:

Ao Professor Luiz Armando De Marco, pelo incentivo e cobrança, e por ter, através de seu laboratório, oferecido materiais essenciais para realização de algumas etapas da pesquisa;

Ao Professor Eduardo Pimentel Dias, meu mestre dentro da Endocrinologia e responsável direto pela minha formação endocrinológica, por ter sido o grande mentor da idéia central desse trabalho, pela orientação durante todo o projeto, por ter fornecido o material dos pacientes do estudo, e pelo incentivo e cobrança;

À Professora Paula Vidigal e à acadêmica Paula Santos, pela supervisão e execução da imunohistoquímica, pela revisão da anátomo-patologia e pelo seu registro fotográfico;

À Professora Marta Sarquis, pelo precioso auxílio na revisão do trabalho;

À Professora Emília Sakurai e à Juliana Alvares, do Núcleo de Apoio Bioestatístico da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo grande auxílio na análise estatística do trabalho;

À Professora Janete Cerutti, pela atenção e colaboração no esclarecimento de dúvidas relacionadas ao estudo;

Ao meu Pai, Professor Francisco José Penna, pelo exemplo de médico, de ética, de pesquisador, de conhecimento, de dedicação e amor à vida acadêmica, por ser o meu maior mestre e pelo seu incentivo e apoio constantes;

À Universidade Federal de Minas Gerais, por ser a instituição acolhedora que é, e por oferecer totais condições à execução desse projeto;

Os meus sinceros agradecimentos.

## Índice:

	<b>Página</b>
1. Abreviaturas e Siglas	4
Introdução	5
2.1- Visão panorâmica sobre o processo molecular da tumorigênese	7
2.2-Visão panorâmica sobre a tumorigênese do CPT	8
2.2.1-Proto-oncogenes	9
2.2.2-Genes supressores de tumor em Sítios Cromossômicos frágeis	12
2.2.3-Outros genes supressores de tumor	14
2. Objetivo	18
3. Materiais e Métodos	19
4. Resultados	21
5. Discussão	28
6. Referências Bibliográficas	37
7. Anexo 1- Soluções utilizada na Imunohistoquímica	46
8. Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
9. Anexo 3- Métodos Estatísticos	50

## **Abreviaturas e Siglas:**

CPT: Carcinoma Papilar Tireodiano

SEER: *Cancer Institute Surveillance Epidemiology End Results*

TNM: Tumor, Nódulos (metástases linfonodais), Metástases distantes

CDKs: Kinases dependentes de ciclina

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

FHIT: *Fragile Histidine Triad*

SDR: *Short chain alcohol Dehydrogenase-Reductase*

## INTRODUÇÃO:

A última década trouxe avanços relevantes relacionados à tumorigênese tireoidiana, sendo muitos desse avanços decorrentes do progresso tecnológico, que proporcionam novas oportunidades e também novos desafios. A melhor compreensão da genética molecular do câncer de tireóide vêm se tornando relevante para o manejo da doença (Trovisco *et al.*, 2007)

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina mais prevalente, com incidência de 4 e 12 por 100000 indivíduos, em homens e mulheres respectivamente, representando aproximadamente 1% de todos os cânceres (Puxeddu *et al.*, 2007; Trovisco *et al.*, 2007,3). Dados recentes do *National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and Results* (SEER) estimaram que em 2009 trinta e sete mil e duzentas pessoas -10 mil homens e 27.200 mulheres - serão diagnosticados com câncer de tireóide e que 1.630 pessoas morrerão dessa doença nos Estados Unidos da América (EUA) (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>). O carcinoma papilífero de tireóide (CPT) representa virtualmente 80% de todos os carcinomas tireoidianos, e dados recentes de inquéritos epidemiológicos indicam que o câncer de tireóide é o câncer humano com maior aumento de incidência nos EUA (aumento anual de 6,3% de 1997-2003), sem, entretanto, haver aumento da mortalidade (0,5 / 100000). Dados do SEER mostram que a incidência do CPT aumentou de 2,7 para 7,7 por 100.000 pessoas, no período de 1973-2002 (aumento de 2,9 vezes) (Tuttle *et al.*, 2009). Esse aumento na incidência tem sido associado à melhor sensibilidade dos métodos diagnóstico, levando ao diagnóstico de tumores muito pequenos (aproximadamente metade dos tumores diagnosticados são menores que 1 cm- microcarcinoma). Apesar do prognóstico favorável do microcarcinoma papilífero, a taxa de mortalidade associada pode ser tão alta quanto 1%, a taxa de metástases distantes pode alcançar 2,5% e a taxa de recorrência linfática tão elevada quanto 5%. Esse fato, associado ao comportamento agressivo atribuído a alguns casos de PTC clássicos ressalta a necessidade de indicadores mais poderosos para diagnóstico e prognóstico desse tumor (Trovisco *et al.*, 2007).

O critério diagnóstico do CPT ainda é baseado nas características citológicas nucleares: aumento e irregularidade nuclear, fendas,

pseudoinclusões, coloração pálida – aspecto de vidro fosco. Pode-se ainda utilizar alterações morfológicas adicionais que podem estar presentes, tais como os corpos psamomatosos (Trovisco et al., 2007).

O estadiamento dos pacientes após cirurgia para tumores malignos de tireóide, segundo o último Consenso Brasileiro de Nódulos e Câncer diferenciado de Tireóide (Maia et al., 2007), deve ser realizado utilizando o sistema TNM (quadro 1 e 2).

QUADRO 1: Classificação TNM para Câncer de Tireóide (modificado de Maia et al., 2007)

<b>T (TUMOR)</b>	<b>N (METÁSTASES LINFONODAIS)</b>	<b>M (METÁSTASES DISTANTES)</b>
<b>T1</b> < ou = 2 cm (T1a < ou = 1 cm T1b 1–2 cm) <b>T2</b> 2–4 cm <b>T3</b> > 4 cm limitado à tireóide ou com invasão extra-tireoidiana mínima <b>T4a</b> invasão de subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou recorrente laríngeo <b>T4b</b> invasão de fáscia pré-vertebral ou envolvimento de carótida ou vasos mediastinais <b>Tx</b> tamanho desconhecido sem invasão extra-tireoidiana	<b>N0</b> ausentes <b>N1a</b> metástases no nível VI <b>N1b</b> metástases cervicais (laterais) ou em mediastino superior  <b>Nx</b> linfonodos não avaliados	<b>M0</b> ausentes <b>M1</b> metástases distantes  <b>Mx</b> não avaliado

QUADRO 2: Estratificação de risco pós-operatório dos pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide (modificado de Maia et al., 2007)

<b>Risco</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Ressecção tumoral</b>
Muito baixo risco	T1a ou T1b, único	N0	M0	completa
Baixo risco	T1 multifocal ou T2	N0	M0	completa
Alto risco	T3 ou T4	N1	M1	incompleta

Visão panorâmica sobre o processo molecular da tumorigênese:

O câncer é o resultado de alterações moleculares onde o fenótipo maligno resulta de uma alteração genética que pode ser transmitida da célula alterada para suas células filhas. Diariamente, milhões de células se dividem no organismo adulto normal, e, a cada divisão estamos expostos ao efeito de inúmeros carcinógenos ambientais (Ward, 2002) ou erros inatos da divisão celular. Entretanto, o aparecimento e desenvolvimento de um clone de células tumorais é um evento relativamente raro, e isso se deve às inúmeras barreiras fisiológicas que a célula necessita romper para se tornar cancerígena. As barreiras primárias são os pontos de controle do próprio ciclo celular (fig.1).

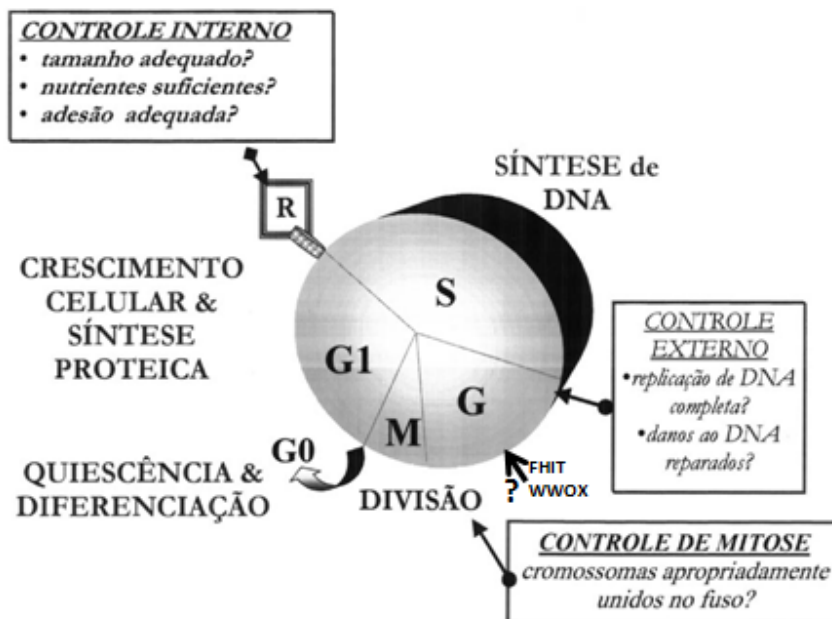


FIG. 1 Pontos de controle do ciclo celular (modificado de Ward, 2002)

A progressão pelo ciclo celular é, em parte, controlada por uma série de proteínas chamadas “quinases dependentes de ciclina” (CDKs), e, essas quinases, por sua vez, fosforilam uma série de substratos-chave que permitirão a progressão de uma fase à outra do ciclo celular. Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras de tal progressão no ciclo de divisão celular, através de inibidores das CDKs. Cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é codificada por um gene (oncogenes e genes supressores tumorais) e anormalidades nesses genes podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e



desenvolvimento sobre as células normais. Portanto, mutações nesses genes podem levar à desregulação do ciclo celular(fig.2).

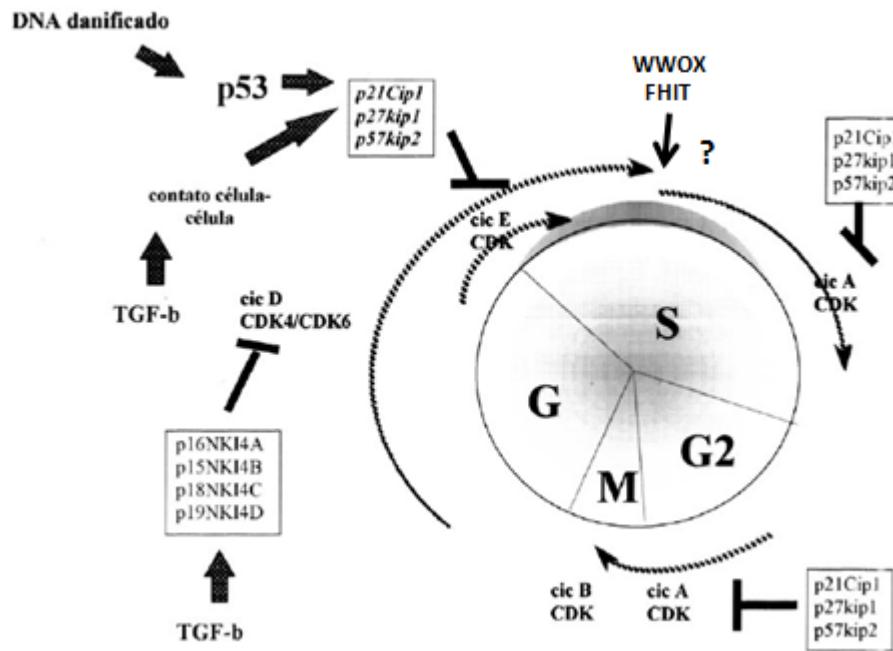


FIG.2 Fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular (modificado de Ward, 2002)

As mutações envolvendo oncogenes são mutações ativadoras e podem ocorrer por translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral, mutação pontual. Os produtos da ativação desses genes atuam de forma dominante (a mutação de um único alelo pode ser suficiente para desenvolver a neoplasia). Já os genes supressores de tumores atuam de forma recessiva (ambos os alelos devem estar perdidos ou não-funcionantes).

Visão panorâmica sobre a tumorigênese do CPT:

Vários oncogenes (*RAS*, *RET*, *TRK*) e genes supressores tumorais (*p53*, *Rb*, *p16*, *p21*) têm sido associados com a carcinogênese tireoidiana (Kresimir et. al., 2006). O epitélio tireoidiano é o segundo mais comum (após o tecido hematopoiético) em que os produtos das fusões entre genes são críticos para o desenvolvimento do câncer. A patogênese molecular do CPT, como em todo processo de tumorigênese - conforme explicado acima - envolve um desequilíbrio entre as vias reguladoras do ciclo celular, com aumento da

atividade das vias estimuladoras (hiperexpressão de um proto-oncogene) e/ou perda de função das vias supressoras tumorais. A maioria dos estudos sobre tumorigênese do CPT refere-se à hiperfunção dos proto-oncogenes, e, alguns poucos estudos relatam alterações nos genes supressores de tumor.

Proto-oncogenes:

A transformação das células tireoidianas foliculares normais em células cancerígenas é um processo de várias etapas, que envolve alterações genéticas associadas com aberrações no controle do crescimento, perda de diferenciação e capacidade de invasão (Meireles et al., 2007). No PTC essa transformação parece envolver uma via comum de ativação constitutiva de membros da MAPK (*Mitogen Activade Protein Kinase*), que promovem divisão celular. As duas vias de sinalização mais freqüentemente relatadas envolvem dois oncongenes: o rearranjo *RET/PTC* e/ou a mutação em ponto do gene codificador da proteína BRAF.

Os rearranjos genéticos são freqüentemente detectados em neoplasias hematológicas e mesenquimais, sendo pouco freqüentes em carcinomas. O câncer de tireóide é um dos poucos tipos de carcinoma que apresentam essa singularidade. O rearranjo do gene *RET* (*RET/PTC*) envolve sua fusão com genes heterólogos, resultando em proteínas quiméricas, que levam a uma ativação persistente e aberrante do domínio tirosina kinase. O gene *RET* está localizado no cromossomo 10q11.2 e contém 21 exons que ocupam mais de 60kb do DNA genômico (Maciel et al., 2005). Foi isolado há aproximadamente 20 anos (Fusco et. al. 2007), e é normalmente expresso nas células derivadas da crista neural. O *RET* tipo selvagem é também expresso nas células parafoliculares, sendo sua expressão nas células foliculares ainda discutível (Trovisco et al., 2007). O rearranjo cromossômico mais freqüentemente detectado no PTC, como relatado acima, envolve os receptores dos fatores de crescimento tirosina quinase (TK) - *RET*, que regulam o crescimento, diferenciação, morte programada dos neurônios no sistema nervoso periférico e central. Mais de 15 rearranjos tem sido descritos, sendo os *RET/PTC 1*, *RET/PTC 2* e *RET/PTC 3* os *RET* proto-oncogenes mais frequentes no PTC (60-70% *RET/PTC1* e 20-30% *RET/PTC3*). O rearranjo pode ser tanto paracêntrico, com os genes *H4* e *ELE1* (*RET/PTC1* e *RET/PTC3*,

respectivamente), ou translocação recíproca, como a descrita no *RET/PTC 2*, que envolve o gene *PRKAR1A*, codificando R1 $\alpha$  no 17q23. O *RET/PTC1* é associado ao CPT clássico, enquanto o *RET/PTC3* é associado ao subtipo sólido e à variante de células altas, sendo um evento precoce na carcinogênese tireoidiana. A prevalência desses rearranjos somáticos do proto-oncogene *RET* no PTC esporádico variam de 3-60% (Trovisco et al., 2007), sendo essa ampla variação reflexo provável de estudos com diferentes métodos e diferentes amostragens geográficas. Sua incidência aumenta após exposição à radiação.

O *BRAF* é um dos três membros da família *RAF* de serina/treonina kinases – *ARAF*, *BRAF* e *CRAF*, que são efetores da via MAPK: *RAF*-*MEK*-*ERK*. Essa via é crítica na transdução de sinais pelos fatores de crescimento, por hormônios e citocinas, estando, portanto, envolvida na regulação da proliferação celular (Trovisco et al., 2007). Mutações no *BRAF* facilitam a instabilidade genômica, aumentam o poder de invasão e, por fim, intensificam a desdiferenciação tumoral, além de suprimir mais significativamente a apoptose (Puxeddu et. al., 2007). Uma análise da expressão gênica do CPT associada com mutações *BRAF* mostra uma redução importante da expressão de genes relacionados com a maquinaria do metabolismo do iodo intratireoidiano e aumento da regulação das proteínas pró-angiogênicas, como o *Vascular-endothelial growth factor* (*VEGF*) (Puxeddu et. al., 2007). A mutação do *BRAF* tem sido descrita em melanoma (63-66%), carcinoma ovariano (33-44%) e carcinoma colorretal (11-20%). A maioria das mutações (90%) ocorre em ponto, no exon 15, ocorrendo uma mutação somática do tipo transverso de timina para adenina (T1799A), resultando na substituição de uma valina por ácido glutâmico na sequência peptídica da proteína (V600E), levando à ativação constitutiva da *BRAF*-quinase (Ridgway et al., 2007). Essa é a alteração genética mais freqüente descrita nos CPTs (29-83% dos casos). Nessa mutação há a inserção de um resíduo carregado negativamente, adjacente a um sítio de fosforilação Ser59 o que causa a ruptura de interações hidrofóbicas entre resíduos exatamente no local de ligação de ATP que mantinha a conformação inativa (Maciel et al., 2005). Outras mutações relatadas são *BRAF* K601E (aproximadamente 7% dos casos), detectadas quase exclusivamente nos casos de variante folicular do carcinoma papilífero

(VFCPT), e ainda mutações G474R e VK600-1E. Todas essas mutações desestabilizam a conformação inativa da BRAF quinase e induzem a ativação oncogênica constitutiva da enzima. (Trovisco et al., 2006; Puxeddu et al., 2007).

A mutação BRAF V600E e as mutações nos genes *RAS* e *RET/PTC* compreendem aproximadamente 70% dos casos de CPT, sendo que, na maioria dos casos de CPT, elas são mutuamente exclusivas (uma vez que alteram a mesma via de sinalização RET/PTC-RAS-BRAF-MEK-ERK) (fig3) (Trovisco et al., 2007)

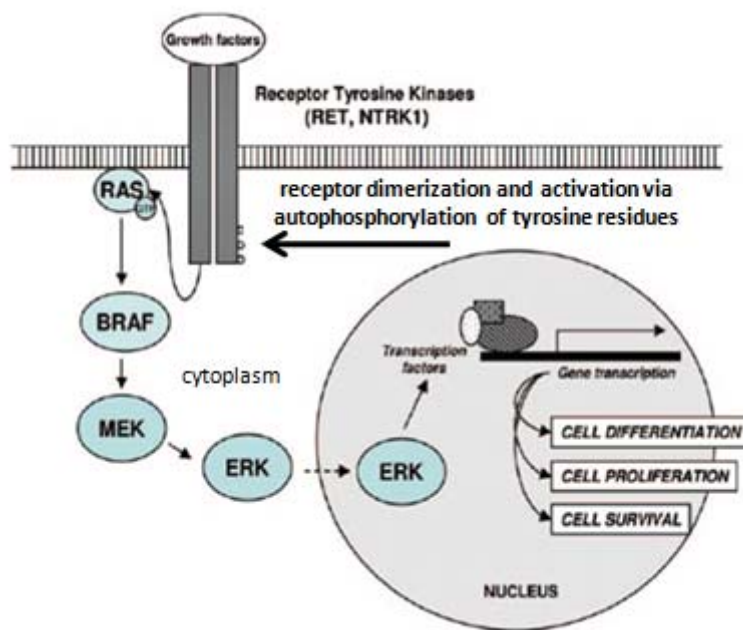


FIG.3 Representação esquemática da via de sinalização MAPK (modificado de Ciampi et al., 2007)

A relação entre as mutações acima descritas (RET/PTC e BRAF) e os parâmetros clínico-patológicos desfavoráveis do tumor ainda é controversa, embora diversos estudos associem essa mutação V600E à presença de metástase linfonodal, maior taxa de recorrência, extensão extratireoidiana, baixa capacidade de captação de iodo radioativo e ao aumento da invasão vascular (aumento da expressão do VEGF), enfim, a um pior prognóstico (Adeniran et al., 2006; Jo et al., 2006; Lee et al., 2007; Puxeddu et al., 2007; Trovisco et al., 2007, Elisei et al., 2008, Oler et al., 2009).

Genes supressores de tumor em Sítios Cromossômicos frágeis:

Sítios frágeis comuns ou constitutivos são regiões cromossômicas observadas em cromossomos metafásicos de todos os indivíduos e que se apresentam como quebras ou falhas desses cromossomos, quando expostos à agentes que retardam a replicação celular como, por exemplo, inibidores da DNA polimerase (Glover, 2005; Sbrana et al., 2006, Pichiorri et al., 2008). São descritos mais de 80 sítios frágeis (80 SCF comuns, e 24 SCF raros), (Iliopoulos et al., 2005; Pichiorri et al., 2008), compreendendo mais de 100Mb do DNA genômico, sendo que as quebras e lacunas em apenas 20 desses sítios representam 80% das lesões observadas. Considerando a hierarquia pela freqüência de expressão temos FRA3B>FRA16D>FRA6E>FRA7G>FRAXB (Louise et al., 2006). São regiões altamente recombinantes, sendo locais de translocações cromossômicas, deleções, ampliações e integrações de DNA exógeno em células pré-neoplásicas e neoplásicas (Pichiorri et al., 2008). Caracterizam-se pelo envolvimento de DNA instável e recombinante nessa translocação, pela troca de cromátides-irmãs, pela amplificação gênica e pela integração viral (Sbrana et al., 2006) . Logo após a descoberta dos sítios cromossômicos frágeis, no início da década de 80 (Glover et. al, 1984), foi observado que muitas dessas regiões coincidiam com regiões cromossômicas alteradas em determinados cânceres e, então, nascia a idéia de que esses sítios cromossômicos frágeis poderiam abrigar esses genes implicados no desenvolvimento do câncer (Pichiorri et al., 2008). A partir daí, especulou-se que esses sítios frágeis poderiam predispor a rearranjos cromossômicos, e que, genes aí localizados estavam sujeitos à instabilidade genômica e poderiam contribuir na iniciação ou progressão do câncer quando deletados, translocados ou amplificados. Foi, então, iniciada a busca pela caracterização genômica dessas regiões, sendo o mais ativo dos sítios frágeis – FRA3B – intensamente estudado em 1996, identificando-se nessa região o gene supressor de tumor *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*). Esse sítio FRA3B codifica genes que estão envolvidos na proteção das células do acúmulo de DNA danificado, proteção essa que é crítica nas células somáticas durante várias fases da vida. Essa proteção se dá através de sinais para interromper a progressão no ciclo celular, sinais para reparar o dano ou sinais para iniciar a

apoptose (através da interação do FHIT com ferredoxina- reductase, que gera espécies reativas de oxigênio). Quando esses genes estão alterados, o câncer pode ocorrer (Pichiorri et al., 2008). O FHIT, formado por 1,6 Mb, é considerado o arquétipo dos genes supressores de tumor e possui mais de 500 relatos de alteração na sua expressão em cânceres humanos (Iliopoulos et al., 2005), incluindo aqueles do trato gastrointestinal alto, cólon, pulmão (onde a inativação do *FHIT* foi primeiramente notada), mama e tireóide. (Connolly et al., 2000; Sozzi et al., 2000; Kitamura et al., 2001; Glover, 2006; Iliopoulos et al., 2006 ).

O segundo sítio de cromossômico frágil mais freqüente (FRA16D) é onde se encontra o gene *WWOX*, e está associado a deleção homozigótica (detectada em vários tipos de cânceres). Esse gene *WWOX* (*domain contain oxiredutase*), localizado no cromossomo 16q23.3-24,(28) – região cromossômica envolvida em perda de heterozigose em muitos tipos de cânceres - codifica uma proteína com dois domínios WW e um domínio SDR (*Short chain alcohol Dehydrogenase-Reductase*), e tem atividade pró-apoptótica. (fig4.)

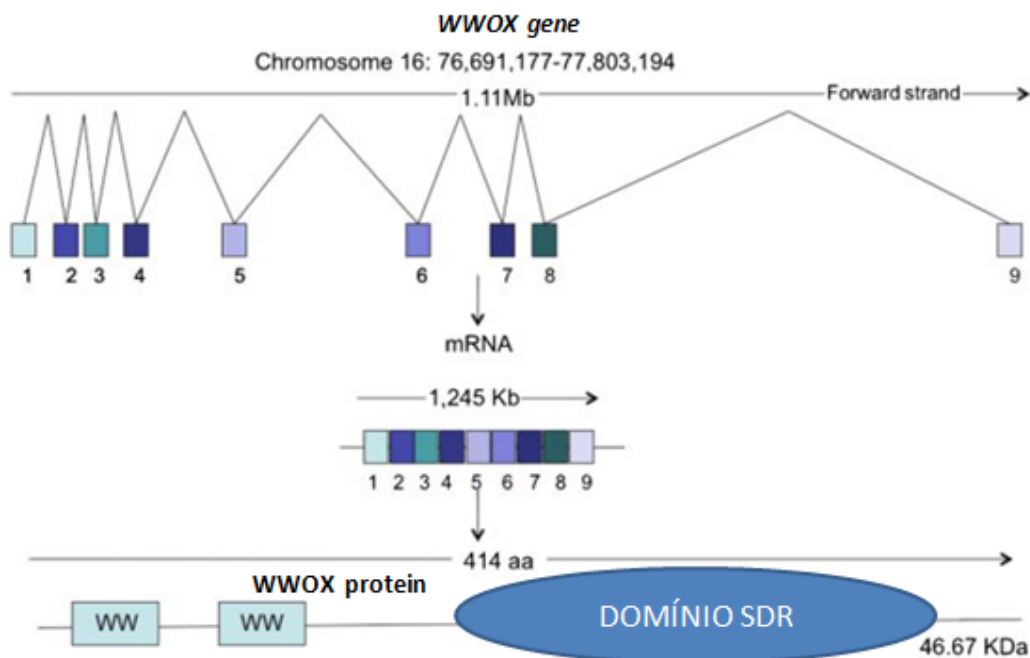


FIG. 4 Gene *WWOX* e seu produto (proteína *WWOX*)  
(modificado de Del Mare et al., 2009 )

Sua expressão aberrante está presente em vários tipos de cânceres (mamário, ovário, próstata, gástrico, hematopoiético, esofágico, hepático, pulmonar). (Ludes Meyers et al., 2003; Guler et al., 2004; Iliopoulos et al., 2006; Nunez et al., 2007; Louise et al., 2006; Dias et al., 2007). Estudos prévios mostraram uma redução na expressão do WWOX em 50% dos carcinomas de células escamosas da cavidade oral, quando comparado com a mucosa normal. Aqelain et al. (2007) mostraram que a perda de ambos os alelos do gene WWOX resultou em osteosarcoma em ratos no período pós-natal precoce, enquanto a perda de um alelo resultou no aumento da incidência de tumores espontâneos e quimio-induzidos. O WWOX exerce sua atividade apoptótica, interagindo com proteínas que apresentam motivos tirosina, como p53 e p73. (fig.5)

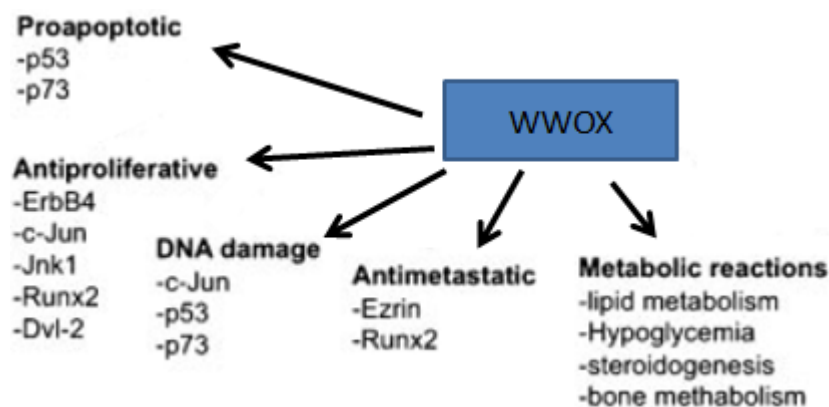


FIG. 5 Vias de sinalização do WWOX  
(modificado de Del Mare et al., 2009 )

Outros genes supressores de tumores:

Vários genes supressores tumorais (*p53*, *Rb*, *p16*, *p21*) têm sido associados com a carcinogênese tireoidiana (Kresimir et. al., 2006). Desses, o mais estudado é o gene *p53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (Corapcioglu et al., 2006). Sua mutação está presente em aproximadamente 50% de todos os cânceres humanos e representa a alteração genética mais comum em células malignas (Morita et al; 2008). O dano no DNA foi o primeiro tipo de estresse descoberto na ativação do *p53*, e, por isso, esse gene é amplamente considerado como o “guardião do genoma humano” (Efeyan et al., 2007).

A ativação da resposta p53 mediada diretamente pelo dano no DNA ocorre através de múltiplas vias, como a já bem estabelecida via ATM/ATR/Chk1/Chk2, acrescida, provavelmente de outras quinases, tais como p38, JNK/SAP e c-Abl. A ativação do p53 por sinalização de oncogenes ocorre via ARF (Efeyan et al., 2007) (fig.6).

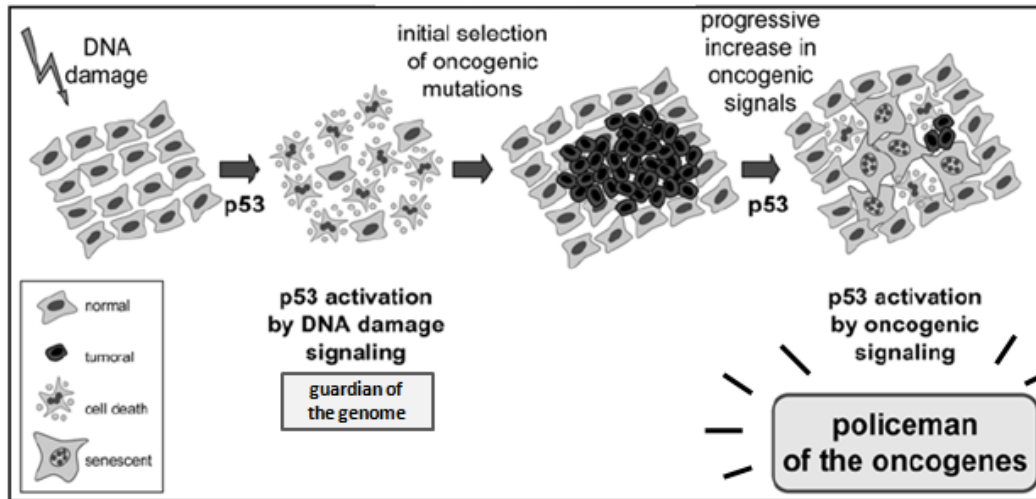


FIG. 6 Vias de ativação do p53  
(modificado de Efeyan et al., 2007)

Segundo Efeyan et al. (2007), a ativação do p53 pelo dano no DNA parece exercer apenas uma pequena proteção adicional contra o câncer, porque muitas dessas células danificadas, tendo ou perdendo o p53, irão ser eliminadas seja pela apoptose p53 dependente ou pela morte celular p53 independente (pela “catástrofe mitótica”, através de estímulo a outras forma de morte celular, desencadeada pelo dano celular) (fig7). Essas duas vias podem estar inter-conectadas, como por exemplo as espécies reativas de oxigênio produzida na apoptose gerando dano ao DNA.



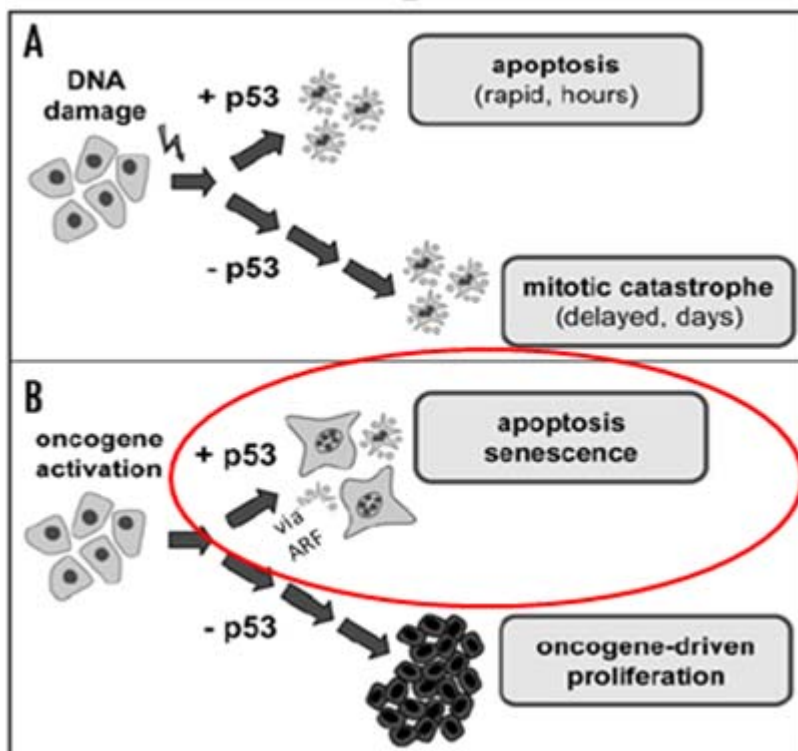


FIG. 7 Diferente impacto da ação do p53 no destino celular sob sinalização direta do dano no DNA ou sob sinalização do oncogene (modificado da Efeyan et al., 2007)

Em suma, evidências recentes sugerem que o p53 pode ter apenas um pequeno impacto no destino das células com DNA danificado, enquanto pode ter um papel fundamental no destino das células sob sinalização oncogênica.

Após essa visão panorâmica sobre a tumorigênese do CPT, ressalto que alguns estudos já analisaram a expressão das proteínas transcritas pelos genes acima citados e de outras proteínas em amostras tireoidianas, como o estudo do Liang et al. (2009), que analisaram a expressão de p53, FHIT, p16, E-cadherin, MMP-7, HBME-1, MMP-2, PTTG, hTERT em amostras tireoidianas, tumorais e não-tumorais, a fim de identificar marcadores protéicos com potencial de indicar malignidade. Os resultados mostraram que MMP-2, HBME-1, p16 e FHIT foram independentemente associados a tumores tireoidianos malignos, sendo o HBME-1 aquele considerado de melhor acurácia, e o uso desse juntamente com o p16 foram aqueles que forneceram melhor sensibilidade e especificidade para identificação de malignidade. Dias et al. (2007), avaliaram a expressão da proteína WWOX em tumores benignos e

malignos de tireóide, mostrando que a baixa expressão do WWOX no CPT pode ser uma etapa importante na sua tumorigênese.

Outros estudos avaliaram alterações moleculares, como mutações genéticas, em tecido tumoral tireoidiano. Meireles et al. (2007), rastrearam mutações em oncongenes (*BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*) e genes supressores tumorais (*p53*), envolvidos na carcinogênese tireoidiana. Mutações em ponto no *BRAF* foram as mais comumente encontradas no CPT, seguidas do rearranjo *RET/PTC*, sendo que mutação no *p53* se mostrou um raro evento em tumores bem-diferenciados de tireóide. Pavelic et al. (2006) avaliaram alterações moleculares em dois genes supressores de tumor (*FHIT* e *p53*), bem como a intensidade de suas atividades apoptóticas, em tumores benignos e malignos de tireóide. A maioria dos tumores malignos apresentaram aberrações (*FHIT* - perda de exon; *p53* –mutação em ponto no códon 237, perda de heterozigose ) do *FHIT* e do *p53* (principalmente em tumores pouco diferenciados e CPT com metástases à distância), acompanhado de uma baixa taxa de apoptose, o que sugeriu ser importante para o desenvolvimento e/ou progressão do câncer de tireóide. Sbrana et al (2006) demonstraram associação entre dois sítios frágeis FRA3B e FRA16D, em linfócitos de pacientes com CPT na área de Bellarus, 14 anos após o acidente de Chernobyl. Outros estudos ainda mostraram aberrações no gene *FHIT* relacionadas ao câncer de tireóide (Mc Mclver et al., 2000, Zou et al.,1999), bem como do *p53* (Donghi et al., 1993; Zou et al., 1993; Morita et al., 2008).

Portanto, a participação dos oncongenes *BRAF* e *RET/PTC* está bem definida e consolidada na tumorigênese do CPT, e, atualmente, diversos estudos têm demonstrado a possível participação de genes supressores de tumor tanto no desenvolvimento quanto na progressão do câncer de tireóide.

## **OBJETIVO:**

O objetivo desse estudo foi avaliar na carcinogênese papilar tireoidiana, a possível ocorrência concomitante, de alterações na expressão dos três genes supressores de tumor (*FHIT*, *WWOX* e *p53*) e de um oncogene (*BRAF*), bem como correlacionar essas diferentes expressões à agressividade do tumor (muito baixo, baixo e alto risco). Essa hipótese foi avaliada pela análise da expressão das três proteínas acima.

Ênfase foi dada à participação dos sítios de cromossomo frágil na tumorigênese tireoidiana, considerando os estudos prévios citados acima, que mostraram a participação desses genes na tumorigênese do CPT.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

### *Amostras*

Foram incluídos no estudo amostras cirúrgicas de tumores tireoidianos de 16 pacientes submetidos à tireoidectomia total após suspeita diagnóstica de PTC, baseada em laudo citológico de biopsia aspirativa por agulha fina, guiada por ultrassonografia. Todos os pacientes apresentavam provas de função tireoidiana dentro da faixa de referência para o método (T<sub>4</sub> livre e TSH). O material cirúrgico obtido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10% e embebidas em parafina (um a cinco blocos por caso).

### *Preparação dos tecidos e análise histológica*

Cortes de 4µm de espessura foram realizados nos blocos obtidos. Tais cortes, posteriormente, foram fixados em lâminas, desparafinizados e submetidos à técnica de coloração Hematoxilina & Eosina. A avaliação histológica de todas as amostras foi realizada por um único patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG. Essa análise foi realizada em microscópio óptico comum, classificando os CPT de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (1988), sendo 14 CPT de histologia clássica e 2 variantes foliculares. Além disso, alguns casos apresentavam concomitantemente bócio nodular colóide.

### *Imunohistoquímica*

Seções adicionais de parafina foram submetidas à técnica de imunohistoquímica para investigação de alterações na expressão da proteína B-raf, Wwox, p53 e FHIT nas células do CPT.

Para aplicação da técnica, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A seguir, foram mergulhados em solução de EDTA 1mM (pH 8,0), e aquecidos a 96<sup>0</sup>C em vaporizador *steamer* por 30 minutos, para a recuperação antigênica. Após resfriamento e lavagem dos cortes em tampão TRIS, Tris-HCl 0,05M (pH 7,6), os mesmos foram tratados com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, fundamental para o bloqueio da atividade tecidual da peroxidase endógena. Nova lavagem com TRIS foi feita para que, em seguida, os cortes fossem incubados com os anticorpos primários: anti-

BRAF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Estados Unidos) diluído a 1:100, anti-WWOX (Upstate, Estados Unidos) diluído a 1:100, anti-p53 (DakoCytomation, Estados Unidos) e anti-FHIT (Invitrogen, Califórnia) diluído a 1:500. Essa incubação durou 12 horas e foi mantida a 4°C em câmara úmida. Após lavagem em TRIS, as secções foram expostas à solução pós-primária, kit NovoLink™ Max Polymer (Novocastra, Reino Unido). Nova lavagem precedeu a exposição dos cortes ao polímero, kit NovoLink™ Max Polymer, necessário para a amplificação da resposta. A imuno-reação foi visualizada usando diaminobenzidina - DAB, kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Estados Unidos), que foi preparado de acordo com as orientações do fabricante. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e montados com lamínula. As reações tiveram como controles positivos: tecido cerebral normal para BRAF e FHIT, tecido tireoidiano normal para WWOX e carcinoma de cólon para p53; o controle negativo foi realizado sem a utilização do anticorpo primário.

#### *Leitura das lâminas*

Os tecidos foram classificados de acordo com a intensidade da coloração citoplasmática (BRAF, WWOX E FHIT) e nuclear (p53), sendo 1 ausência de marcação, 2 levemente positivo, 3 moderadamente positivo e 4 fortemente positivo.

#### *Considerações éticas*

Este trabalho foi submetido à análise e aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - ETIC 367/07 - e do Hospital Felício Rocho. O termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2) foi assinado por todos os pacientes.

#### *Análise estatística:*

Os dados coletados foram processados com o auxílio do programa Excel (Microsoft Corporation, Estados Unidos). Os grupos foram comparados pelo uso dos testes Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher. O nível de significância dos testes foi estabelecido para um valor de  $p < 0,05$ . (ANEXO 3)

## RESULTADOS:

Todos os 16 carcinomas papilíferos de tireóide foram analisados quanto à extensão de sua coloração. O parênquima tireoidiano normal, adjacente a cada tumor, utilizado como controle positivo, apresentou expressão moderada ou intensa para o FHIT, WWOX e p53 na maioria dos controles. (ANEXO 3.1)

O FHIT apresentou expressão intensa em 100% dos controles analisados, enquanto, nos tumores apresentou expressão intensa em 25%, moderada em 56,25%, leve em 12,5% e ausente em 6,25%. Quando comparamos a expressão entre tumores e controles obtivemos um  $p < 0,001$ . (quadro 3)

O WWOX apresentou, nos controles, expressão moderada em 50%, expressão leve em 42,86% e expressão ausente em 7,14%, enquanto nos tumores apresentou expressão ausente em 64,2%, leve em 21,4%, moderada em 7,14% e intensa em 7,14%. Ao compararmos a expressão entre os tumores e controles obtivemos um  $p < 0,005$ . (quadro 4)

O p53 apresentou, nos controles, expressão moderada em 43,75%, leve em 25%, e intensa em 31,25%, enquanto nos tumores apresentou expressão intensa em 87,5% e moderada em 12,%. Ao compararmos as expressões entre os tumores e controles obtivemos um  $p < 0,004$ . (quadro 5)

Quadro 3: Expressão FHIT

	Tumor	Controle
Ausente	6,25%	0%
Leve	12,5%	0%
moderada	56,25%	0%
Intensa	25%	100%

Quadro 4: Expressão WWOX

	Tumor	Controle
Ausente	64,2%	7,14%
Leve	21,4%	42,86%
moderada	7,14%	50%
Intensa	7,14%	0%

Quadro 5: Expressão p53

	Tumor	Controle
Ausente	0%	0%
Leve	0%	25%
moderada	12,5%	43,75%
Intensa	87,5%	31,25%

Quadro 6: Expressão BRAF

	Tumor	Controle
Ausente	0%	0%
Leve	0%	12,5%
moderada	0%	50%
Intensa	100%	37,5%

Em resumo, os resultados se mostraram com significância estatística, ao compararmos a expressão entre os tumores e os controles conforme se segue:

FHIT- hipoexpresso nos tumores em relação aos controles ( $p < 0,001$ )

WWOX- hipoexpresso nos tumores em relação aos controles ( $p < 0,005$ )

P53- hiperexpresso nos tumores em relação aos controles ( $p < 0,004$ )

Seguem abaixo figuras (número 8 ao número 15) dos diversos tumores papilíferos coradas pela Hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para as proteínas BRAF, FHIT, WWOX e p53, ilustrando os nossos achados acima descritos.

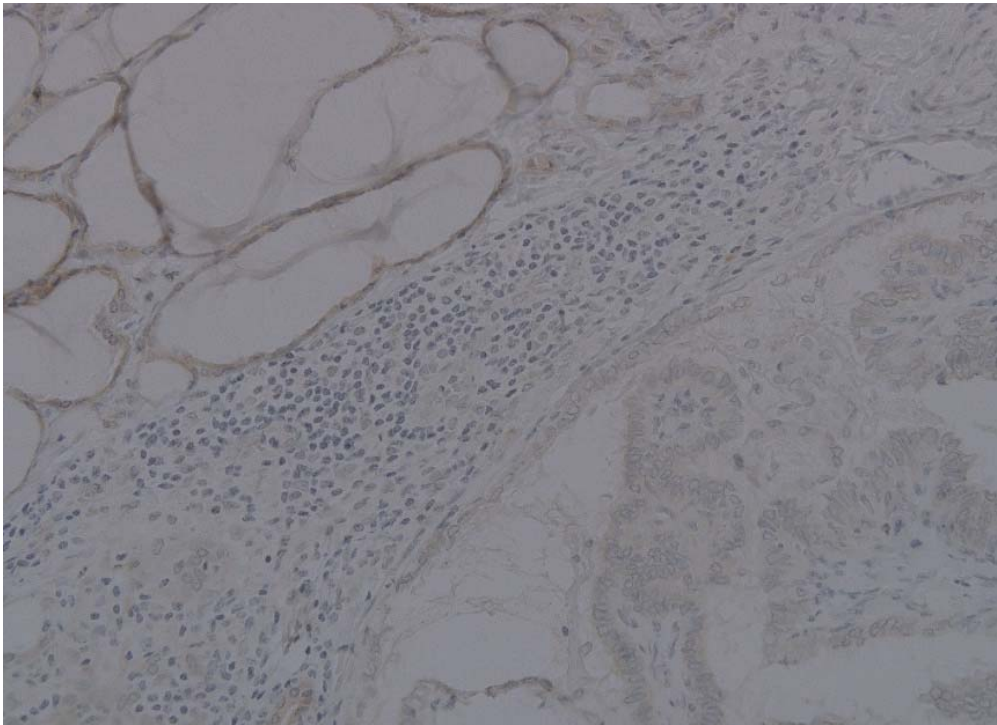


FIG. 8: - Expressão imunohistoquímica da proteína WWOX em parênquima tireoidiano normal (esquerda do observador) mostrando marcação citoplasmática intensa , score 4; carcinoma papilífero da tireóide (direita do observador) mostrando marcação citoplasmática de intensidade leve, score 2 (200x)

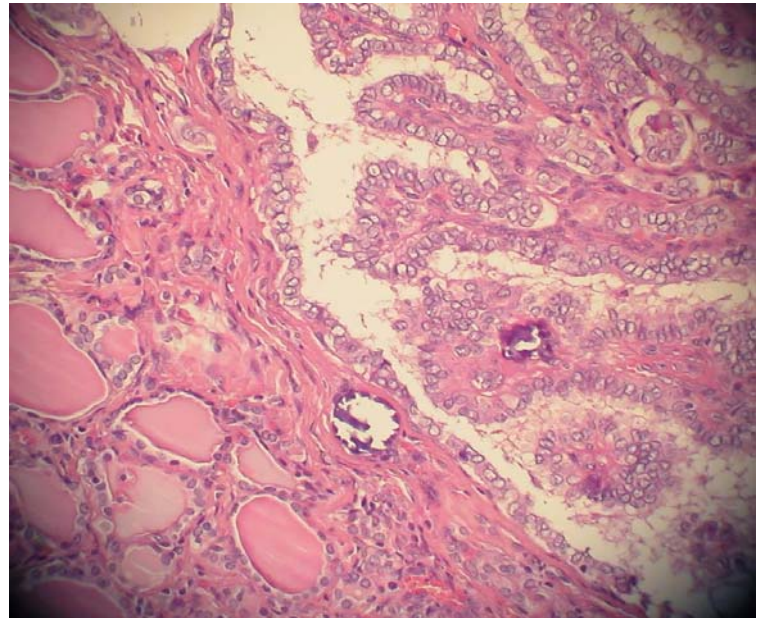
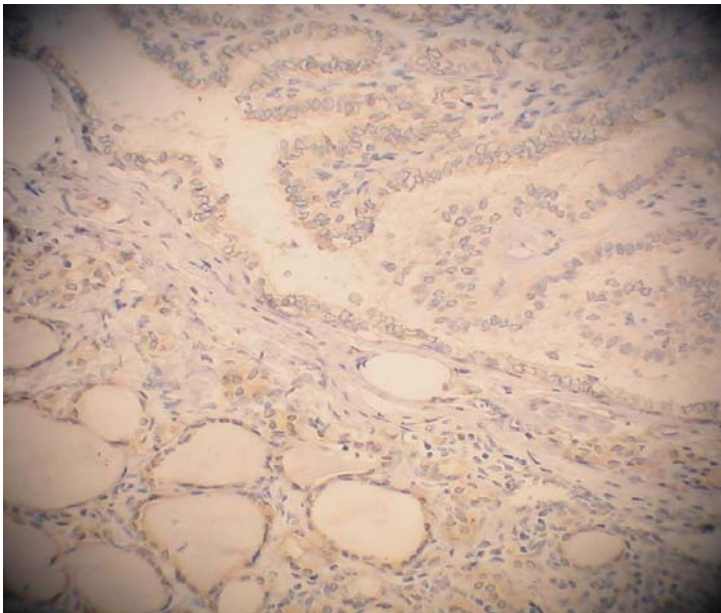


FIG.9: Expressão imunohistoquímica da proteína WWOX: transição de parênquima tireoidiano normal com expressão moderada - score 3 - (parte inferior) e carcinoma papilar com expressão ausente (score 1)



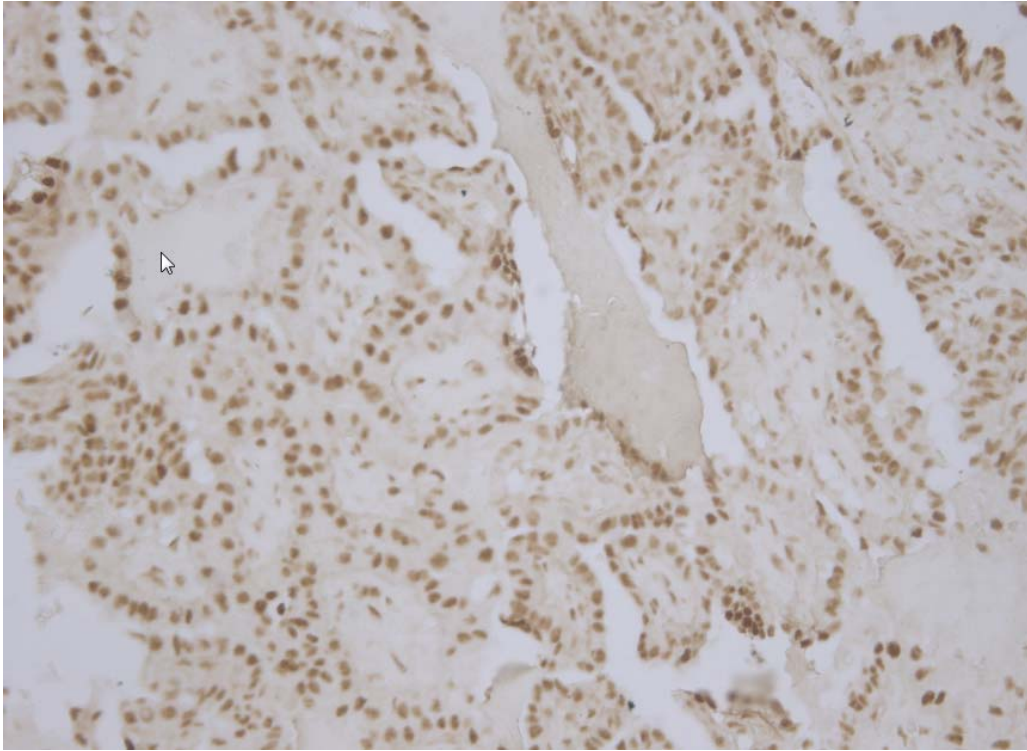


FIG. 10 - Expressão imunohistoquímica de p53 em carcinoma papilar de tireóide mostrando intensa marcação nuclear, score 4 (200x)

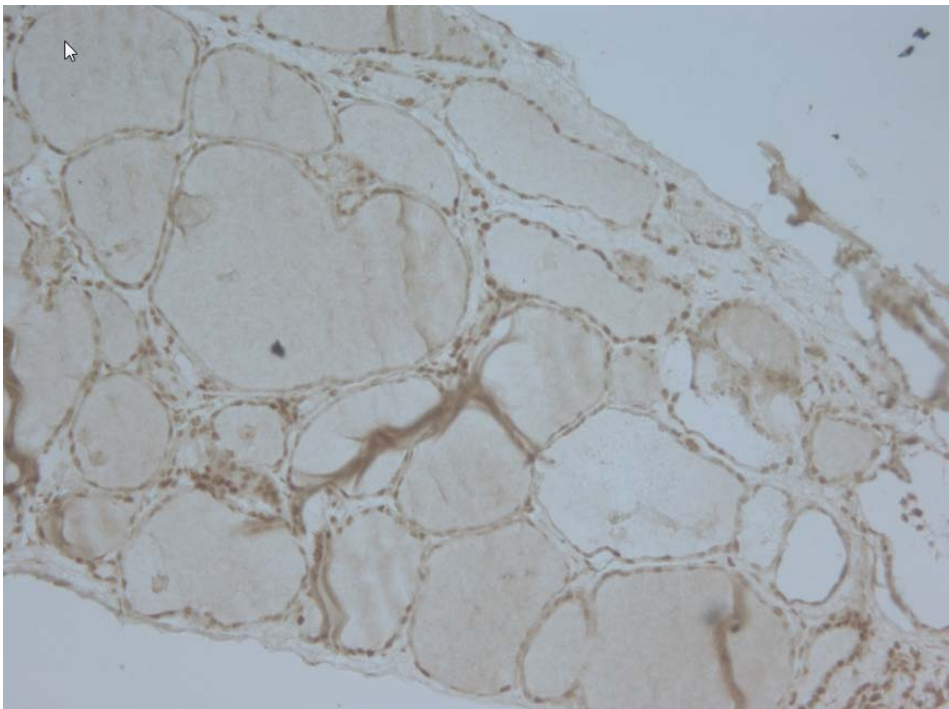


FIG. 11- Expressão imunohistoquímica de p53 em corte histológico de tecido tireoidiano normal mostrando marcação nuclear moderada, score 3 (200x)

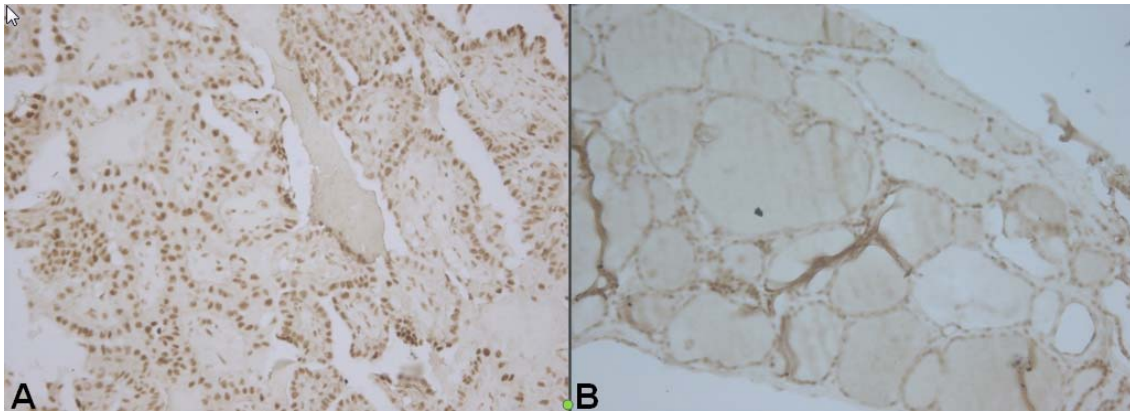


FIG.12 - Imunoexpressão nuclear de p53 em CPT (A) e epitélio folicular tireoidiano (B). Notar o aumento da intensidade da expressão no CPT se comparada ao controle. Aumento de 200X.

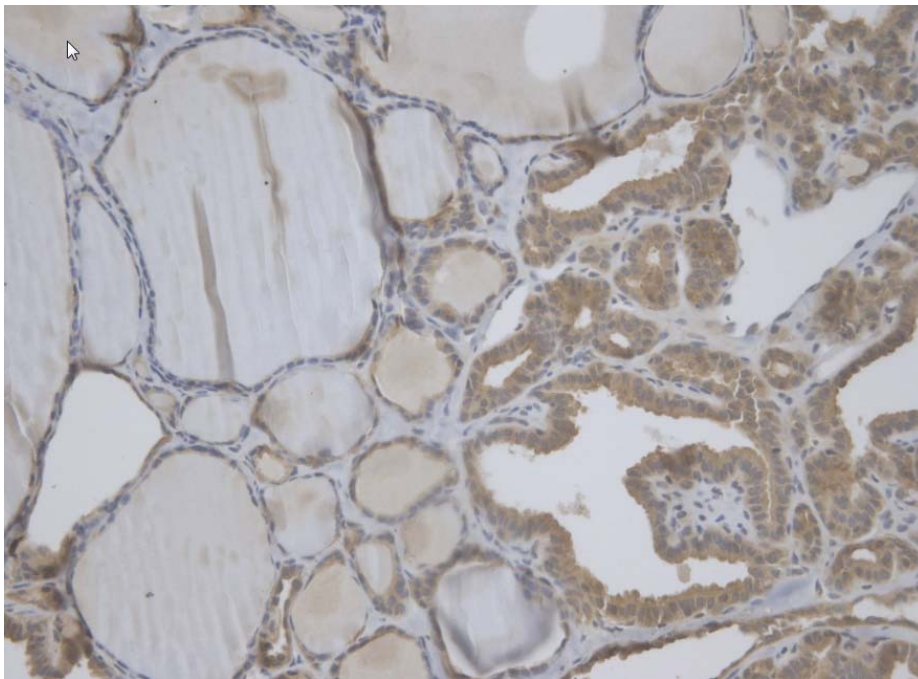


FIG.13- Expressão imunohistoquímica da proteína BRAF em tireóide normal (esquerda do observador) mostrando marcação citoplasmática de intensidade leve, score 2; e carcinoma papilífero da tireóide (direita do observador) mostrando marcação citoplasmática de grande intensidade, score 4 (200x)

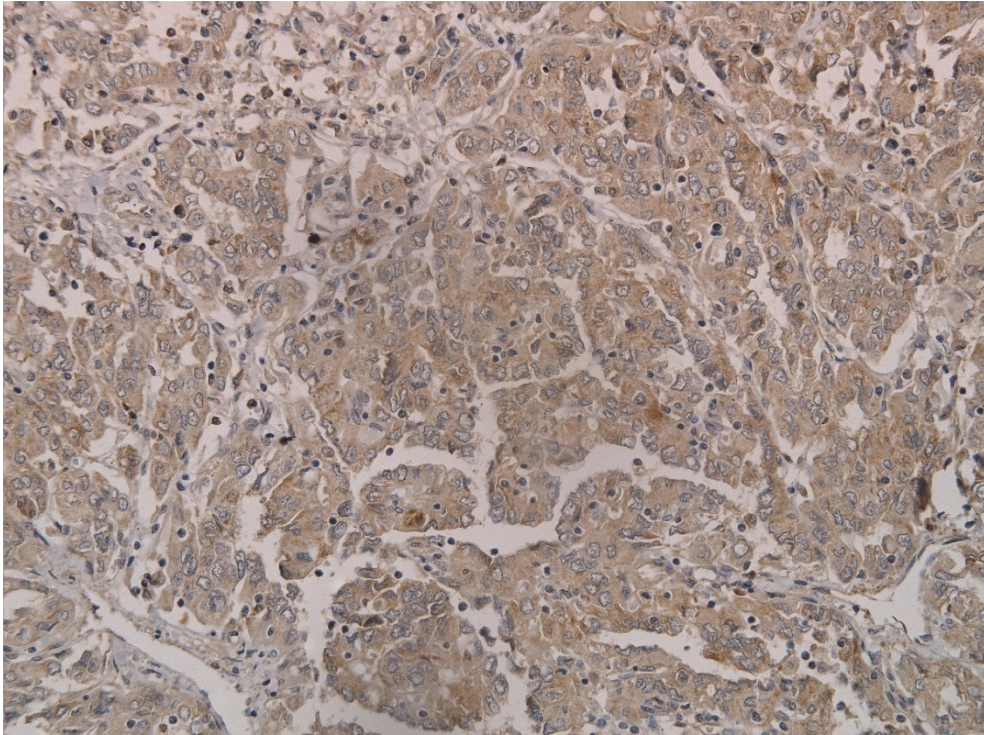


FIG.14- Expressão imunohistoquímica da proteína FHIT em carcinoma papilar de tireóide mostrando marcação citoplasmática de intensidade leve, score 2(200x)

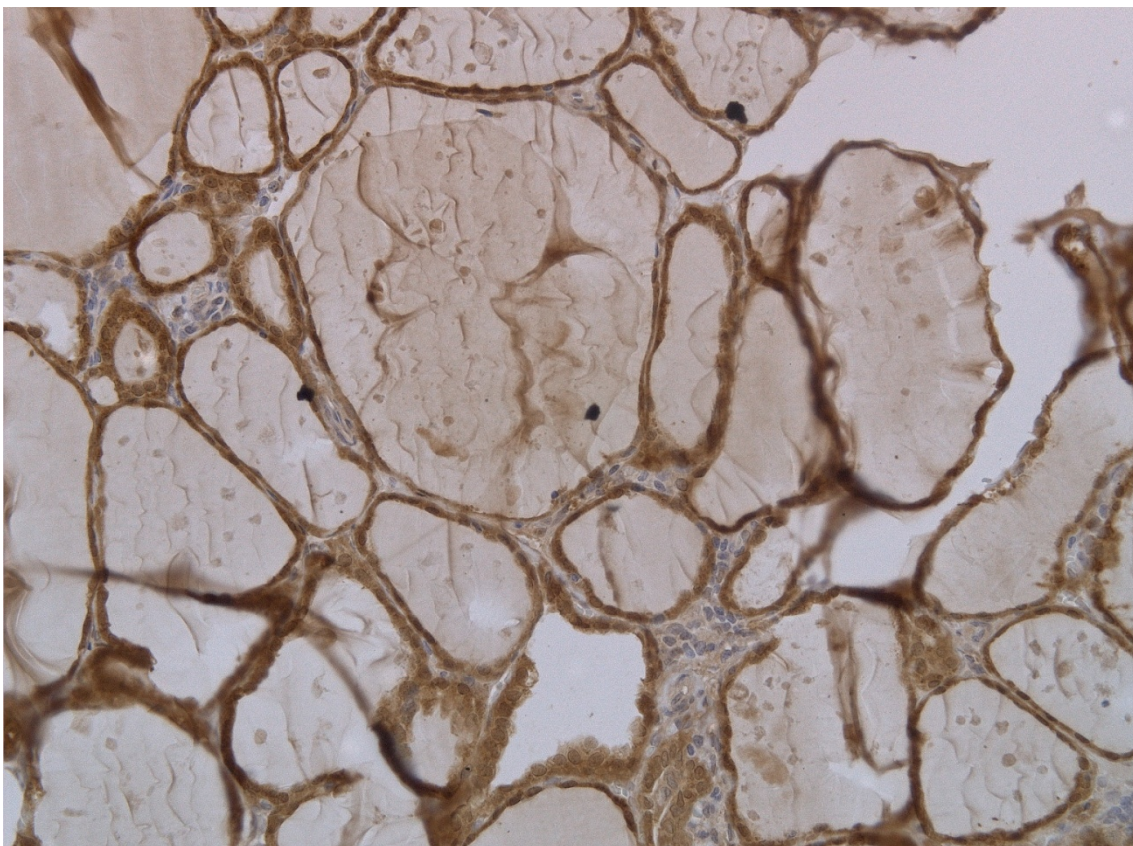


FIG.15 - Expressão imunohistoquímica da proteína FHIT em parênquima tireoidiano normal mostrando marcação citoplasmática de grande intensidade, score 4 (200x)

## Correlação entre as expressões protéicas e as estratificações de risco para os tumores

Ao se analisar a relação entre as expressões protéicas dos genes acima e as estratificações de risco para os tumores (foram agrupados em dois grupos: muito baixo e baixo risco – grupo 1, e alto risco- grupo 2) não houve qualquer correlação com significância estatística (anexo 3.2).

## **DISCUSSÃO:**

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina mais prevalente, representando aproximadamente 1% de todos os cânceres (Puxeddu et al., 2007; Trovisco et al., 2007). O carcinoma papilífero (CPT) representa virtualmente 80% de todos os carcinomas tireoidianos, e, apesar do prognóstico favorável na maioria dos casos, alguns tumores apresentam, comportamento agressivo (metástase linfonodal é detectada em 30-65% dos tumores no momento do diagnóstico, e 15% desses tumores exibe um comportamento muito agressivo) (Oler et al.; 2009) o que ressalta a necessidade de indicadores mais poderosos para diagnóstico e prognóstico do CPT.

Os avanços no conhecimento em relação à tumorigênese do CPT já estão bem esclarecidos e estabelecidos no que se refere ao papel dos oncogenes (*BRAF*, *RET/PTC*, *RAS*) em sua patogênese. Na última década, diversos estudos têm avaliado a participação de genes supressores de tumor na carcinogênese do CPT, e, os resultados têm mostrado, como era de se esperar considerando a patogênese de todo câncer, uma disfunção nesses genes. Dentre os genes estudados, ênfase especial tem sido dada aos situados em sítios cromossômicos frágeis (genes *FHIT* e *WWOX*). O nosso estudo procurou avaliar possíveis alterações na expressão protéica de três genes supressores de tumor (*WWOX*, *FHIT* e *p53*) presentes concomitantemente em 16 tecidos de CPT. Não há, até o momento, na literatura, nenhum estudo que tenha avaliado a expressão concomitante dessas três proteínas em tumores tireoidianos.

Nossos resultados confirmaram no CPT a hipoexpressão do *WWOX*, já previamente demonstrada no trabalho de Dias et al (2007), a hipoexpressão do *FHIT* e a hiperexpressão do *p53*, com diferença estatisticamente significativa quando comparadas a amostras tireoidianas normais da mesma peça. Foi realizada a correlação entre essas diferentes expressões das proteínas *WWOX*, *FHIT* e *p53* e a agressividade do tumor (muito baixo, baixo e alto risco), sem haver nenhuma correlação com significância estatística. Diversos estudos anteriores também não mostraram correlação entre alterações moleculares de alguns desses genes e a agressividade do tumor tireoidiano, embora alguns outros estudos a mostrem, sendo esse ponto ainda controverso

na literatura (Puxeddu et. al., 2007; Trovisco et al., 2007; Elisei et. al., 2008; Oler et al., 2009).

Esses resultados mostram, pela primeira vez, no CPT, a ocorrência concomitante de hipoexpressão das proteínas FHIT e WWOX e hiperexpressão da proteína p53, podendo ser consequente a alterações moleculares nos respectivos genes, fazendo com que a “vigilância” a danos ao DNA esteja prejudicada e, conseqüentemente, também a atividade apoptótica desses genes, podendo ser considerado um fator permissivo para o desenvolvimento e/ou progressão do tumor papilar.

Os sítios cromossômicos frágeis são regiões mais susceptíveis a mutações, devido à sua instabilidade. Muito se tem especulado acerca das razões para a fragilidade e instabilidade desses sítios. Têm sido mostrado que esses sítios são regiões com alta densidade de repetições Alu, nas quais a replicação do DNA é atrasada. Falha na completa replicação das seqüências desse sítios antes da condensação da cromatina em cromossomos metafásicos pode levar a um aumento de lacunas e quebras características desses. (Del Mare et al., 2009). Outros estudos têm associado essa fragilidade à seqüência “AT-rich” levando às alterações conformacionais do DNA, com potencial de formar estruturas secundárias e, por isso, afetar a replicação celular. Talvez essa composição (“AT-rich”) esteja associada à lenta replicação desses sítios frágeis. Essa replicação tardia nestes sítios também tem sido relacionada às quebras e falhas cromossômicas (Glover et al. 2006). Segundo Sbrana et al. (2006), indivíduos mostrando uma alta taxa de quebras no FRA3B também apresentam altas taxas de quebras cromossômicas no FRA16D. Essas fragilidades correlacionadas poderiam ser conseqüentes a uma disfunção do “checkpoint” do ciclo celular (ATR, BRCA1, CHK1, HUS1) (Pavelic et al., 2006), que propiciaria a essas células alcançar uma mitose prematura, sem completar a síntese de DNA ( redução ou ausência da fase de “prisão” nas regiões de inspeção entre S/M ou G2/M do ciclo celular), carregando diversos sítios não replicados, contribuindo para aumento da instabilidade desses sítios frágeis (Pavelic et al., 2006). Glover (2006) também sugere que a essas seqüências AT nos sítios frágeis dificulte a replicação, o que pode ser exacerbada por outras formas de estresse. Essa incompleta replicação pode levar a quebras e falhas cromossômicas, que estimulam a

ativação do “checkpoint” na fase S e/ou G2/M do ciclo celular, mas, muitas dessas alterações cromossômicas nos sítios frágeis escapam desse controle. (Glover, 2006). Outra possível explicação para a instabilidade desses sítios envolvem as alterações nas bandas longitudinais dos cromossomos metafásicos. Os cromossomos metafásicos revelam um distinto padrão de bandas longitudinais alternadas – banda G e R – (Pichiorri et al., 2008) as quais diferem entre si, na sua seqüência, estrutura e função, sendo a banda G com mais regiões “AT-rich”, onde a replicação do DNA ocorre no final da fase S do ciclo celular, enquanto a banda R é mais “GC-rich”, com a replicação do DNA ocorrendo no início da fase S (fig.18) ( Schwartz et al., 2006). O FRA3B foi mapeado para a banda R, e a análise de sua seqüência revelou várias características da banda G (“AT-rich”, pequeno número de genes e alta flexibilidade), alterações essas que podem afetar o controle da replicação do DNA e contribuir para a fragilidade desses sítios. (Louise et al., 2006; Schwartz et al., 2006).

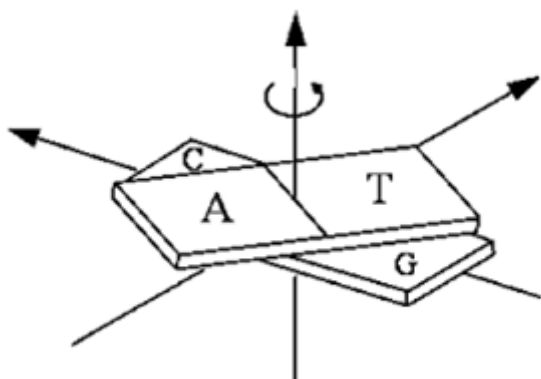


FIG.16 - Bandas G e R dos cromossomos metafásicos  
(modificado de Schwartz et al., 2006)

Quanto ao papel dos genes supressores de tumor presentes nos sítios cromossômicos frágeis (*FHIT* e *WWOX*) nas etapas do controle do ciclo celular, Pichiorri et al.(2008) sugeriram que o sítio cromossômico frágil FRA3B/*FHIT* codifica a proteína que é necessária para a proteção celular contra danos no DNA, exercendo assim função na modulação do *checkpoint* do ciclo celular, determinando a exigência da inspeção (checkpoint), de controle e da competência da apoptose. Alterações moleculares – detalhadas abaixo -

nesses genes supressores de tumor localizados em sítios cromossômicos frágeis estão relacionadas à redução da exigência na inspeção do ciclo celular e pode ser desencadeada por diversos tipos de estresse, estando associada à carcinogênese (Sbrana et al., 2006).

Em relação à função supressora de tumor, o FHIT exerce essa através de sua atividade pró-apoptótica que envolve a via dependente da atividade citoplasmática da caspase-8. O WWOX está envolvido no estresse e na resposta apoptótica, regula a ativação do p53 (ação sinérgica durante a apoptose TNF-mediada) (Louise et al., 2006) e do JNK1 (regula negativamente a atividade apoptótica) (Sbrana et al., 2006), e ainda aumenta a função citotóxica do fator de necrose tumoral (TNF) (Chang et al., 2005). Em resposta ao estresse ou a outro estímulo apoptótico, WWOX torna-se fosforilado na Tirosina 33, o que permite a formação do complexo com o p53 e JNK1 ativados. O WWOX induz apoptose sinergicamente com p53; em contraste, JNK1 pode bloquear a morte celular induzida pelo WWOX.

Os mecanismos de inativação do FHIT são deleções bialélicas, perda de heterozigose, metilação anômala, enquanto mutações em ponto são raras. FRA3B freqüentemente apresenta perda alélica ou deleção homozigótica em muitos tipos de tumor (pulmão, mama, cabeça e pescoço) (Pavelic et al., 2006). Já o WWOX contém deleções nos exons 6,7 e 8, correspondendo ao domínio SDR. Transcrições aberrantes com perda dos exons 5,6,7 e 8 foram detectadas em células de câncer gástrico e de pulmão. Embora mutações em ponto não sejam detectadas, perda de heterozigose é comum em quase um terço das amostras de tumor analisadas (Del Mare et al., 2009). Deleções bialélicas, resultando em perda homozigótica das seqüência do FRA16D, tem sido detectadas em adenocarcinomas de estômago, cólon, pulmão e ovário (Del Mare et al., 2009).

Sítios de cromossomo frágil associados a deleções homozigóticas tem se mostrado instáveis e são um evento precoce na tumorigênese. A perda de expressão do FHIT ocorre como um evento precoce no câncer de mama e outros (Louise et al., 2006).

Apesar de serem locais propensos a mutações, devido à sua instabilidade, esses sítios cromossômicos frágeis são altamente conservados ao longo da evolução das espécies. Intrigante é o fato dessas regiões, que são



tão sensíveis a erros na replicação do DNA sob condições de estresse serem a mesma região que possuem genes com função de proteger contra o câncer. Por isso, especulações sobre o significado dessa estabilidade e do papel desses sítios têm surgido: seriam pontos de quebra genômica, permitindo recombinações cromossômicas associadas com evolução da espécie? Seriam genes do “dia do juízo”, onde, alterações acumuladas ao longo da vida, confeririam condições para o crescimento do câncer, eliminando, inevitavelmente indivíduos que já passaram da idade reprodutiva? Ou ainda, talvez, não tenham função estrutural, mas apenas representam regiões cromossômicas mais susceptíveis a estresse, podendo contribuir para o aparecimento ou desenvolvimento do câncer ? (Pichiorri et al., 2008).

Em relação ao gene p53, sabe-se que esse é também envolvido na tumorigênese tireoidiana, sendo relatado seu envolvimento no desenvolvimento e progressão do câncer de tireóide (Pavelic et al., 2006). A prevalência de mutações no gene p53 em tumores bem diferenciados de tireóide varia de 0% a 25% segundo alguns estudos e de 11% a 59% segundo outros (Morita et al., 2008). No estudo de Morita et al. (2008), a hiperexpressão da proteína p53 foi encontrada em 43% dos casos de PTC. Essa mutação tem sido relacionada à fase de transição entre tumores bem-diferenciados e os anaplásicos (Morita et al., 2008). A perda de função do gene p53 pode levar a desregulação das vias apoptóticas, levando a desestabilização genômica, e, conseqüentemente, promovendo o desenvolvimento de mutações adicionais. Morita et al. (2008) mostraram que, embora as mutações no gene p53 tenham sido, usualmente, detectadas em carcinoma anaplásico, a sua expressão por imunohistoquímica (IH) foi observada em CPT. Esse estudo mostrou hiperexpressão do p53 em CPT, com correlação positiva entre essa expressão e o tamanho do tumor, metástase linfonodal, e número de linfonodos metastáticos.

Quanto à expressão do p53 em nosso estudo, devemos lembrar que a expressão à IH da proteína p53 tem sido motivo de controvérsia na literatura. Diversos estudos, correlacionam a hiperexpressão da proteína p53 à presença de mutação no gene p53, e, ao mesmo tempo justificam que a ausência de expressão ou hipoexpressão da proteína selvagem seria devido à sua curta meia-vida (Corapcioglu et al., 2006; Lim et al., 2007; Zafon et. al , 2007; Morita et al., 2008). Segundo esses estudos, as formas mutadas têm maior

estabilidade e uma meia-vida mais longa, como consequência direta de mudanças estruturais atribuídas à mutação “missense” em ponto, como destacado no estudo de Zafon et al (2007), onde atribuíram a hiperexpressão do p53 pela IH à mutação do gene em até 95% dos casos de CPT. Já Liu et al. (2002) destacaram que hiperexpressão da proteína p53 nem sempre é devido a mutação do gene *p53*, podendo ser influenciado pelo fator de transcrição E2F1, ou pelo produto do oncogene *MYC* ou ainda por deleções no locus do gene *p16*. Ressaltam ainda que os anticorpos utilizados para detectar a proteína p53 mutante têm utilidade limitada, devido ao espectro de mutações que são capazes de detectar (não abrange todas as mutações). Ainda nesse estudo, Liu et al. citam que a sensibilidade e especificidade da IH para prever a presença de mutação no gene *p53* é 75% e 63%, respectivamente. Em nosso estudo, encontramos o p53 mais expresso no CPT, quando comparado ao tecido normal, com significância estatística. Entretanto, a expressão da proteína foi moderada ou intensa em até 75% dos tecidos tireoidianos normais, achado esse que pode ser justificado pelas limitações do uso da IH na detecção de mutações no gene *p53*, acima expostas (estudo de Liu et al., 2007).

Diversos estudos mostram a associação entre o p53, os genes encontrados nos sítios cromossômicos frágeis (FHIT e WWOX) e entre o p53 e oncogenes. O estudo de Aqeilan et al. (2004) demonstrou a interação física entre o WWOX e o p73, gene homólogo do p53. A hiperexpressão do WWOX causa uma redistribuição do p73 do núcleo para o citoplasma, e por isso suprime sua atividade transcritora, e, ao mesmo tempo, a presença do p73 no citoplasma potencializa a atividade apoptótica do WWOX (Aqeilan et al., 2004; Iliopoulos et al., 2006; Del Mare et al., 2009). Em contraste com o estudo de Aqeilan et al. (2004), Chang et al. (2005) aventaram a hipótese do WWOX aumentar a estabilidade do p53, por aumentar a duração de sua localização no núcleo. A interação FHIT-p53 também foi estudada e mostrou que uma proteína com papel essencial na regulação do p53 é a proteína MDM2 - que funciona como uma ubiquitina-ligase para o p53 (que o degrada) - é inativada por ação FHIT-mediada, diminuindo a degradação do p53 no sistema ubiquitina-proteossoma, contribuindo para a estabilidade da proteína p53 (Nishizaki et al., 2004). Estudo de Quiros et al. (2005) avaliou a correlação

entre BRAF e p53, sugerindo que muitos carcinomas anaplásicos com componentes de PTC são derivados do CPT BRAF mutado, devido à adição da mutação do p53 (sugere haver um acúmulo de mutações no p53 em CPT com BRAF mutado). Zafon et al. (2007), analisando o significado clínico da expressão do RET/PTC e do p53 em CPT, mostraram que a expressão do p53 foi mais prevalente em pacientes RET/PTC +, e influenciou, significativamente a relação observada entre RET/PTC e extensão extra-tireodiana da doença. Outro estudo (Powel et al.,2001) que avaliou o papel do RET/PTC, do FHIT e do p53 em tumores tireoidianos, mostrou que o tecido tumoral tireoidiano expressou RET/PTC nos estágios precoces do desenvolvimento tumoral, seguido por uma redução dessa expressão, perda de função do p53 e redução da expressão do FHIT, coincidentes com a progressão tumoral. Esse estudo sugeriu que o rearranjo RET/PTC sozinho é insuficiente para causar o câncer e, provavelmente há a necessidade da ação simultânea ou acumulada de múltiplos genes para a progressão do tumor. Oncogenes dominantes muitas vezes cooperam com genes supressores tumorais mutantes para interromper o crescimento celular normal, a sobrevivência e/ou a diferenciação, e eles podem estar, muitas vezes, co-expressos no câncer. Ainda nesse estudo, é citado um sinergismo entre RET/PTC e o p53 na formação do tumor, indicando que essas duas vias cooperam na progressão do câncer de tireóide. A perda de função do p53 pode ter levado a uma desestabilização genômica, promovendo mutações adicionais, como a do *FHIT*, que se mostrou presente, como um evento tardio na tumorigênese (Powel et al.,2001) (fig.17).

Há um aumento de evidências mostrando que a inativação de múltiplos genes supressores de tumor tem um efeito sinérgico no desenvolvimento e proliferação tumoral.

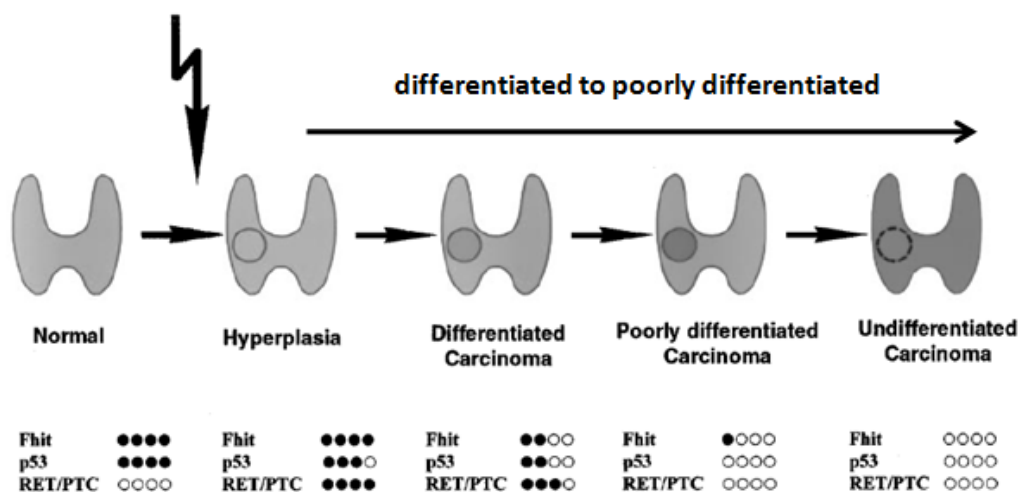


FIG.17- Modelo de progressão tumoral tireoidiano (modificado de Powell et al., 2001)

( ● - presença do produto do gene ; ○ - perda do produto do gene)

Analizamos também a expressão do BRAF, que se mostrou hiperexpresso em todos os tumores, com diferença estatisticamente significativa em relação aos controles. Entretanto, como já bem estabelecido na literatura, a IH para detectar o BRAF mutado não tem utilidade. O anticorpo policlonal utilizado na imunohistoquímica (IH) para a proteína BRAF, detecta tanto BRAF selvagem quanto BRAF mutado, identificando a expressão dessa proteína, independente do status de sua mutação. Portanto, a IH não difere um CPT com BRAF mutado (V600E) de um CPT sem BRAF mutado, uma vez que o BRAF pode ser ativado por outras vias, como por exemplo o RET/PTC, mutação ativadora do RAS, e outros estimuladores dos receptores tirosina quinases em tumores tireoidianos, e se expressar, sem estar mutado (Kondo et al., 2007). O estudo da mutação do BRAF (BRAFFV600E) não foi por nós realizada, pois, além de já está muito bem estabelecida, não tínhamos tecido fresco e a qualidade do material de parafina não nos garantiria a possibilidade de extração do DNA para um adequado seqüenciamento genético.

Nossos resultados mostram que vias distintas de supressão tumoral (vias dos genes supressores de tumores em sítios cromossômicos frágeis – FHIT e WWOX – e possivelmente a via do p53) estão alteradas em todos os tumores papilíferos analisados, com significância estatística ao se analisar as

diferenças de expressão dessas proteínas nesses tumores e em tecidos tireoidianos normais adjacentes. Esse é o primeiro estudo onde é feita a análise da ocorrência concomitante de alterações na expressão desses genes supressores de tumor em CPT. O presente estudo, ao confirmar os resultados dos poucos estudos prévios existentes sobre o tema (FHIT e WWOX em câncer de tireóide), vem reforçar a necessidade de se continuarem as pesquisas sobre o papel dos genes supressores tumorais presentes em sítios cromossômicos frágeis na tumorigênese do CPT. De igual relevância é o valor da imunohistoquímica para detectar alterações na expressão dessas proteínas (FHIT e WWOX) como um método auxiliar no diagnóstico e prognóstico do carcinoma tireoidiano. Melhor definição da literatura sobre o controverso papel da IH na detecção da proteína p53 mutante é esperada. Novos estudos, com um número maior de CPT, se fazem necessário para reforçar nossos achados, bem como para buscar melhor compreensão da inter-relação entre esses genes supressores de tumor e de suas implicações clínicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Adeniran A, Zhu Z, Gandhi M, Steward D, Fidler J, Giordano T, Biddinger P, Nikiforov Y. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 216-222
- Aqeilan R, Pekarsky Y, Herrero J, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, Trapasso F, Han S, Melino G, Huebner K, Croce C. Functional association between WWOX tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4401-4406
- Aqeilan R, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan J, Zanesi N, Kaou M, Stein G, Lian J, Croce C. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3949-3954
- Chang N, Doherty J, Ensing A, Schultz L, Hsu L, Hong Q. WOX1 is essential for tumor necrosis factor-, UV Light-, Staurosporine-, and p53 mediated cell death, and its tyrosine 33-phosphorylated form binds and stabilizes Serine 46-phosphorylated p53. *J Biol Chem* 2005; 280: 43100-43108
- Ciampi R, Nikiforov Y. Minireview: RET/PTC Rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007; 148:936-941
- Connolly D, Greenspan R, Wu R, Ren X, Dunn R, Shah K. Loss of FHIT expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3505-3510

- Corapcioglu D, Sak S, Delibasi T, Tonyukuk V, Kamel N, Uysal A, Kocak S, Aydintung S, Erdogan G. Papillary microcarcinomas of the thyroid gland and immunohistochemical analysis of expression of p53 protein in papillary microcarcinomas. *Journal of Translational Medicine* 2006; 4:28
- Debacker K, Kooy F. Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 150-158
- Del Mare S, Salah Z, Aqeilan R. WWOX: Its genomics, partners, and functions. *J Cell Biochem* 2009; 108:737-745
- Dias E, Pimenta F, Sarquis M, Dias Filho M, Aldaz C, Fuji J, Gomez R, De Marco L. Association between decreased WWOX protein expression and thyroid cancer development. *Thyroid* 2007; 17: 1055-1059
- Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Porta G, Pierotii M. Gene *p53* mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *Clin Invest* 1993; 91: 1753-1760.
- Efeyan A, Serrano M. p53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007; 6: 1006-1010
- Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F. BRAF<sup>V600E</sup> mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3943-3949

- Fagin J, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer:diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 955-969
- Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzon E, Belfiore A, Vigneri R. BRAF<sup>(V<sup>600E</sup>)</sup> Mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 191-205
- Fusco A, Santoro M. 20 Years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 731-735
- Glover T, Berger C, Coyle J, Echo B. DNA polymerase a inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* 1984; 67:136-142
- Glover T. Common fragile sites. *Cancer Letters* 2006; 232: 4-12
- Guler G, Uner A, Guler N, Han S, Iliopoulos D, Hauck W, McCue P, Huebner K. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 1605-1614
- Iliopoulos D, Guler G, Han S, Druck T, Ottey M, McCorkell K, Huebner K. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Letters* 2006; 232: 27-36
- Jo S, Li S, Song J, Kwon K, Lee J, Rha S, Lee H, Sul J, Kweon G, Ro H, Kim J, Shong M. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of



vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3667-3670

Kitamura A, Yashima K, Okamoto E, Andachi H, Hosoda A, Kishimoto Y. Reduced FHIT expression occurs in early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis. *Oncology* 2000; 61: 205-211

Kondo T, Nakazawa t, Murata S, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa S, Katho R. Enhanced BRAF protein expression is independent of V600E status in thyroid carcinomas. *Human Pathol* 2007; 38: 1810-1818

Kresimir P, Rogerio A, Sanja K, Tamara C, Cristiano R, Davor D, Senka R, Kornelije B, Boris P, Simun K, Zvonko K, Sime S, Miljenko B. Molecular genetic alterations of FHIT and p53 genes in benign and malignant thyroid gland lesions *Mutat Res* 2006; 599:45–57

Lee J, Lee E, Kim Y. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid. A meta-analysis. *Cancer* 2007; 110: 38-46

Liang H, Zhong Y, Luo Z, Huang Y, Lin H, Luo M, Zhan S, Su H, Zhou S, Xie K. Comparative analysis of protein expression in differentiated thyroid tumours: A multicentre study. *J Int Med Res* 2009; 37: 927-938

Lim D, Baek K, Lee Y, Park W, Kim M, Kang M, Jeon H, Lee J, Cha B, Son H, Kang S. Clinical, histopathological, and molecular characteristics of papillary thyroid microcarcinoma. *Thyroid* 2007; 17: 883-888

- Liu M, Gelmann E. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002; 29: 246-257
- Louise V, Richards R. Common chromosomal fragile sites and cancer: Focus on FRAD16D. *Cancer Letters* 2006; 232: 37-47
- Ludes-Meyers J, Bednarek A, Popescu N, Bedford M, Aldaz C. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRAD 16D, cancer gene, *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 101-110
- Lupi C, Gianini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. Association of BRAFV600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4085-4090
- Maciel R, Kimura E, Cerutti J. Patogênese dos tumores diferenciados da tireóide (papilífero e folicular). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005; 49: 691-700
- Mclver B, Grebe S, Wang L, Hay I, Yokomizo A, Liu W, Goellner J, Grant C, Smith D, Eberhardt N. FHIT and TSG101 in thyroid tumours: aberrant transcripts reflect rare abnormal RNA processing events of uncertain pathogenetic or clinical significance. *Clin Endocrinol.* 2000; 52:749-757
- Meireles A, Preto A, Rocha A, Rebocho A, Máximo V, Pereira- Castro I, Moreira S, Feijão T, Botelho T, Marques R, Trovisco V, Cirnes L, Alves C, Velho S, Soares P,1,2 Sobrinho-Simões M. Molecular and genotypic

characterization of human thyroid follicular cell carcinoma–derived cell lines. *Thyroid* 2007; 17: 707-715

Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2008; 32: 2617-2622

Nishizaki M, Sasaki J, Fang B, Atkinson E, Minna J, Roth J, Ji L. Synergistic Tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 5745-5752

Nunez M, Ludes-Meyers J, Abba M, Kil H, Abbey N, Page R, Sahin A, Klein-Szanto A, Aldaz C. Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 89: 99–105

Okumara H, Ishii H, Pichiorri F, Croce C, Mori M, Huebner K. Fragile gene product, FHIT, in oxidative and replicative stress responses. *Cancer Sci* 2009; 100: 1145-1150

Oler G, Cerutti J. High Prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 2009; 115: 972-80

Pavelic K, Dedivitis R, Kapitanovic S, Cacev T, Guirado C, Danic D, Radosevic S, Brkic K, Pegan B, Krizanac S, Kusic Z, Spaventi S, Bura M. Molecular genetic alterations of FHIT and p53 genes in benign and malignant thyroid gland lesions. *Mutat Res* 2006; 599: 45-57

- Pichiorri F, Ishii H, Okumura H, Trapasso F, Wang Y, Huebner K. Molecular parameters of genome instability: roles of fragile genes at common fragile sites. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1525-1533
- Powell Jr D, Russel J, Li G, Kuo B, Fidanza V, Huebner K, Rothstein J. Altered gene expression in immunogenic poorly differentiated thyroid carcinomas from RET/PTC<sup>p53-/-</sup> mice. *Oncogene* 2001; 20: 3235-3246
- Puxeddu E, Moretti S. Clinical prognosis in BRAF-mutated PTC. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 736-747
- Quiros R, Ding H, Gattuso P, Prinz R, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 2005; 103: 2261-2268
- Ridgway E, Tomer Y, Mclachlan. Update in thyroidology. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3755-3761
- Sbrana I, Veroni F, Nieri M, Puliti A, Barale R. Chromosomal fragile sites FRA3b and FRA16D show correlated expression and association with failure of apoptosis in lymphocytes from patients with thyroid cancer. *Genes, Chromosomes Cancer* 2006; 45: 429-436
- Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. The Molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 2006; 232: 13-26
- Shibru D, Chung K, Kebew E. Recent developments in the clinical of the thyroid cancer biomarkers. *Current Opin Oncol* 2008; 20: 13-18

- Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998; 58: 5032-5037
- Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Máximo V, Simões-Sobrinho M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma – great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 643-653
- Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 781-786
- Tuttle M, Ross D, Martin K. Overview of papillary thyroid cancer. Up to date 2009.
- Ward L. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46: 351-360
- Watanabe R, Hayashi Y, Sassa M, Kikumori T, Imai T, Kiuchi T, Murata Y. Possible involvement of BRAFV600E in altered gene expression in papillary thyroid cancer. *Endocrine J* 2009; 56: 407-414
- Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245-262.
- Zafon C, Obiols G, Castellví J, Tallada N, Baena J, Simó R, Mesa J. Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 2006; 50: 225-231

Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova M, Gandhi M, Nikiforov I. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 3603-3610

Zou M, Shi Y, Farid N. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:1054-1058

Zou M, Shi Y, Farid N, Al-Sedairy S, Paterson M. FHIT gene abnormalities in both benign and malignant thyroid tumours. *Eur J Cancer* 1999; 35: 467-472

## **ANEXO 1 – Soluções Utilizadas na Imunohistoquímica:**

### Soluções utilizadas para coloração HE:

1 - Álcool ácido

HCl .....1mL

Álcool 70% .....99mL

2 - Água amoniacal

Amônia .....1mL

Água destilada..... 1L

### Soluções utilizadas para imunohistoquímica:

1- Peridrol

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.....10mL

Água destilada.....90mL

4 - Tris HCl 0,05M (pH 7,6)

Tris-HCl..... 0,6 g

NaCl..... 8,1g

Água destilada.....1L

5 - EDTA 1mM (pH 8,0)

EDTA.....0,372 g

Água destilada.....1L

## **ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### ***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido***

---

**Nº Registro COEP:** \_\_\_\_\_

**Título do Projeto:** *Análise de genes candidatos em neoplasias tireoidianas*

#### **Termo de Esclarecimento**

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa de título: “*Análise de genes candidatos em neoplasias tireoidianas*”.

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado(a).

#### **Objetivo do estudo**

Este projeto está sendo proposto porque há pouco conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos cânceres da tireóide. O objetivo desse trabalho é o de estudar, em uma população brasileira, as interações clínicas, genéticas, ambientais e neurobiológicas no desenvolvimento de tumores da tireóide. A partir desta compreensão, esperamos, no futuro, desenvolver tratamentos que possam melhor atender aos pacientes com câncer da tireóide.

#### **Procedimentos**

Todos os(as) participantes, pessoas entre 18 e 65 anos de idade, que assinarão termo de consentimento esclarecido, serão considerados sujeito de pesquisa e irão seguir os procedimentos dessa pesquisa. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este; por isso a sua participação é importante.

Os únicos inconvenientes aos quais os pacientes poderão ser submetidos serão a coleta de sangue total. Esse procedimento, quando realizado, o será por pessoas qualificadas. O desconforto da coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina e é realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido (20 ml de sangue) será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para a paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamentos de qualquer espécie. Será também utilizado o material cirúrgico retirado da tumor, durante o seu tratamento e que encontra-se disponível e conservado em bloco de parafina. Para que este material seja disponibilizado para a pesquisa precisaremos da sua autorização, não sendo necessário nenhum procedimento



adicional. Do bloco de parafina será extraída pequena quantidade de material que será corado com uma técnica especial para a finalidade prevista no projeto de pesquisa. O restante do bloco será devolvido, íntegro, ao laboratório de origem.

### **Pesquisadores**

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Luiz Armando De Marco (coordenador da pesquisa), Dr. Eduardo Pimentel Dias, Dra. Maria Marta Sarquis Soares, Dr. Gustavo Cancela e Penna.

### **Confidencialidade**

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o senhor/senhora queira poderá ter acesso aos resultados individuais.

### **Benefícios e riscos**

Esta pesquisa não oferece qualquer risco ao participante, uma vez que consiste apenas de coleta de sangue total e utilização de material conservado em bloco de parafina. Esta pesquisa é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos nos cânceres de tireóide. Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor/senhora não está abrindo mão de seus direitos legais

### **Desligamento**

A sua participação nesse estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr(a) \_\_\_\_\_ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reserve-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dr. Eduardo Pimentel Dias, no telefone 3295-4432, ou Dra. Maria Marta Sarquis Soares, no telefone 3295-5206, ou Dr. Luiz Armando De Marco, no telefone 3409-9134 ou Dr. Gustavo Cancela e Penna, no telefone 3224-3088. Caso seja necessário, você pode entrar em contato com o COEP/UFMG, sito à Av. Antonio Carlos 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Belo

Horizonte – 31270-901, telefone 3499-4592, fax 3499-4027, e-mail [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br), onde maiores esclarecimentos poderão ser obtidos.

Eu, \_\_\_\_\_, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, autorizo, se necessário for, a retirada de 20 ml de sangue e de material incluído em bloco de parafina, para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro, ainda, que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Assinatura do participante

---

## ANEXO 3- Resultados das Análises Estatísticas

### ANEXO 3.1- Expressão Protéica à Imunohistoquímica

Nº	Anticorpo								Estratificação de risco
	Raf-B (C-19)	p < 0,01	FHIT	p < 0,001	WVOX	p < 0,005	p53	p < 0,004	
01	4	3	4	4	1	3	3	4	3
02	4	3	3	4	1	2	4	2	3
03	4	2	4	4	2	2	4	3	3
04	4	4	2	4	2	3	4	4	1
05	4	3	4	4	3	3	4	2	1
06	4	4	3	4	2	3	4	4	2
07	4	4	3	4	1	2	4	2	3
08	4	3	4	4	1	3	3	3	1
09	4	2	3	4	1	2	4	3	1
10	4	4	3	4	1	3	4	3	
11	4	3	3	4			4	2	
12	4	4	3	4	1	2	4	3	
13	4	4	1	4			4	3	
14	4	3	3	4	1	1	4	4	1
15	4	3	2	4	4	2	4	3	1
16	4	3	3	4	1	3	4	4	1

Legenda:

Caso

Controle

Expressão:

1-ausente

2-leve

3-moderada

4-intensa

Estratificação de risco

1- Muito baixo risco

2- Baixo risco

3- Alto risco

## ANEXO 3.2: Correlação Entre as Expressões Proteicas e a Estratificação de Risco para Cada Paciente

### Relação da expressão do Raf-B(C19) com o risco estimado

		Risco_estimado		Total
		Muito baixo e baixo risco	Alto risco	
Raf -B(C19)	Intensa	8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%
Total		8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%

Não é possível calcular o qui-quadrado porque Raf-B(C19) é constante

### Relação da expressão do FHIT com o risco estimado

		Risco_estimado		Total
		Muito baixo e baixo risco	Alto risco	
FHIT	Leve	2 100,0%	0 ,0%	2 100,0%
	Moderada	4 66,7%	2 33,3%	6 100,0%
	Intensa	2 50,0%	2 50,0%	4 100,0%
Total		8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%

Valor-p = 0,472

### Relação da expressão do WWOX com o risco estimado

		Risco_estimado		Total
		Muito baixo e baixo risco	Alto risco	
WWOX	Ausente	4 57,1%	3 42,9%	7 100,0%
	Leve	2 66,7%	1 33,3%	3 100,0%
	Moderada	1 100,0%	0 ,0%	1 100,0%
	Intensa	1 100,0%	0 ,0%	1 100,0%
Total		8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%

Valor-p = 0,733

**Relação da expressão do P53 com o risco estimado**

		Risco_estimado		Total
		Muito baixo e baixo risco	Alto risco	
P53	Moderada	1 50,0%	1 50,0%	2 100,0%
	Intensa	7 70,0%	3 30,0%	10 100,0%
Total		8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%

**Valor-p = 0,584**